

Izolace a purifikace plazmidové DNA (princip metody)

Pro izolaci plazmidové DNA z buněk se používá řada různých metod. Tyto metody vždy zahrnují tři základní kroky: růst bakteriální kultury, izolaci bakterií a jejich lyzi, purifikaci plazmidové DNA.

Růst bakteriální kultury

Plazmidy se nejčastěji izolují z bakteriální kultury (rostoucí v médiu obsahující příslušné antibiotikum), která byla inokulována jednou kolonií odpíchnutou z agarové plotny. Většina plazmidových vektorů používaných v současné době (např. pUC řada) se replikuje jako vícekopiové vektory a je u nich možné dosáhnout vysokého výtěžku při izolaci z kultury, která rostla ve standardním LB médiu do logaritmické fáze růstu. Avšak vektory dřívější generace (např. pBR322), které se nereplikují tak snadno, vyžadují selektivní amplifikaci několikahodinovou inkubací částečně rostoucí kultury v médiu s chloramfenikolem. Chloramfenikol inhibuje syntézu proteinů a tak zabraňuje replikaci bakteriálního chromozómu, avšak replikace relaxovaných plazmidů pokračuje a počet jejich kopií se zvyšuje.

Izolace a lyze bakterií

Bakterie jsou získány centrifugací a lyzovány jednou z mnoha metod zahrnujících působení detergentů, organických rozpouštědel, alkalického pH nebo tepla. Volba jedné z těchto metod závisí na velikosti plazmidu, bakteriálním kmeni a metodě, která bude následně použita pro purifikaci plazmidové DNA:

1. Velké plazmidy (> 15 kb), které jsou citlivé na poškození, by měly být izolovány metodou minimalizující působení fyzikálních sil (lyze dodecylsulfátem sodným).
2. Pro malé plazmidy je možné použít více metod. Po přidání EDTA a v některých případech lysozymu jsou buňky vystaveny působení detergentu a lyzovány varem nebo alkalicky. To způsobí denaturaci chromozomální DNA, která je obvykle již ve formě lineárních fragmentů. Naproti tomu vlákna plazmidové DNA, tvořená kovalentně uzavřenými molekulami se při denaturaci nerozcházejí, protože jsou vzájemně propletená a mohou na rozdíl od lineárních fragmentů rychle renaturovat.
3. Lyze varem není doporučována při izolaci z kmenů produkujících endonukleázu A. Endonukleáza A není varem kompletně inaktivována a plazmidová DNA může být degradována během následných inkubací za přítomnosti Mg^{2+} . Tomuto problému lze předejít zařazením extrakce s fenol:chloroformem.

Purifikace plazmidové DNA

Proteiny odstraňujeme extrakcí směsí fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1) a poté chloroform:isoamylalkohol (24:1).

Precipitaci DNA provádíme 96 % ethanolem po přidání 3M octanu sodného.

Odstranění RNA provádíme působením pankreatickou RNázou.

Vysoce čisté kovalentně uzavřené kružnicové DNA je možné získat po centrifugaci v gradientu CsCl-ethidium bromid.

Z dalších metod je možné použít pro purifikaci plazmidové DNA precipitaci polyetylenglykolem, chromatografii a komerční metody.

Izolace DNA plazmidu pUC18 metodou alkalické lyze (protokol).

1. Naočkovat jednu bakteriální kolonii do 2 ml LB media obsahujícího ampicilin (100 µg/ml). Inkubovat kulturu přes noc při 37°C za intenzivního třepání.
2. Přenést 1,5 ml kultury do mikrocentrifugační zkumavky. Centrifugovat při 12 000 g 5 minut při 4 °C na mikrofuze.
3. Odsát médium pasterkou (nebo slít) tak aby bakteriální pelet zůstal co nejsušší.
4. Resuspendovat bakteriální pelet ve 100 µl roztoku A.

Roztok A (TEGlu pufr)

50 mM glukóza

25 mM Tris.Cl (pH 8,0)

10 mM EDTA

Roztok sterilizovat autoklávováním 15 minut / 121 °C a uchovávat při 4 °C

Přidat lysozym do konečné koncentrace 500µg/ml a RNázu do konečné koncentrace 10 µg/ml. Intenzivně promíchat na vortexu.

5. Přidat 200 µl čerstvě připraveného roztoku B.

Roztok B

0,2 M NaOH (čerstvě naředěné z 10 M zásobního roztoku)

1 % SDS

Opatrně promíchat několikerým převrácením zkumavky. Uložit zkumavku na ledu 5 min.

6. Přidat 150 µl roztoku C předem vychlazeného na ledu.

Roztok C

5 M octan draselný 60 ml

ledová kyselina octová 11,5 ml

H₂O 28,5 ml

Výsledný roztok je 3M ve vztahu k K⁺ a 5 M ve vztahu k acetátu.

Promíchat několikerým převrácením zkumavky. Uložit zkumavku na ledu 5 -10 min.

7. Centrifugovat při 12 000 g/10 min/4 °C na mikrofuze. Přenést supernatant do čisté zkumavky.
8. Přidat stejné množství fenol:chloroformu, několikrát protřepat a centrifugovat při 12 000 g/5 min/4 °C na mikrofuze. Přenést supernatant do čisté zkumavky. Opakovat extrakci s chloroformem.
9. Přidat 1/10 objemu 3 M octanu sodného pH 5,2, promíchat a vysrážet dsDNA dvěma objemy vychlazeného 96% ethanolu. Nechat směs stát 10 min při -70 °C.
10. Centrifugovat vysráženou DNA při 12 000 g/15 min/4 °C na mikrofuze.
11. Promýt 1 ml 70 % ethanolu (nechat stát 10 min při pokojové teplotě).
12. Odsát supernatant pasterkou, odstranit všechny kapky ze stěn zkumavky a zkumavku nechat vyschnout ve vakuu.
13. Rozpustit DNA v 50 µl TE pufru pH 8,0. Uchovávat při -20 °C nebo krátkodobě při 4 °C.

TE pufr

10 mM Tris.Cl, pH 8,0

1 m M EDTA

Roztok sterilizovat autoklávováním 20 min/121 °C.